

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 A61K 35/84, A23L 1/28	A1	(11) 国際公開番号 WO98/27992  (43) 国際公開日 1998年7月2日(02.07.98)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04352</p> <p>(22) 国際出願日 1997年11月28日(28.11.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/342025 1996年12月20日(20.12.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友林業株式会社 (SUMITOMO FORESTRY CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目7番28号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 藤宮芳章(FUJIMIYA, Yoshiaki)[JP/JP] 〒302-01 茨城県北相馬郡守谷町みずき野2丁目10-12 Ibaraki, (JP)</p> <p>海老名卓三郎(EBINA, Takusaburo)[JP/JP] 〒980 宮城県仙台市青葉区広瀬町2-12 Miyagi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 BR, CN, ID, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: ANTITUMOR ACTIVE SUBSTANCES</p> <p>(54) 発明の名称 抗腫瘍活性物質</p> <p>(57) Abstract A hot water-insoluble and ethanolic extraction residue component of the fruit bodies of <i>Agaricus blazei</i> Murill belonging to the genus <i>Agaricus</i> is extracted with a 5 % aqueous ammonium oxalate solution, and the extract is decomposed with hydrochloric acid and purified by gel filtration and affinity chromatography to prepare an antitumor active substance comprising fractions respectively having, as measured by gel filtration, a weight average molecular weight of <math>38 \times 10^4</math> daltons and a degree of dispersion of 2.3, a weight average molecular weight of <math>29 \times 10^4</math> daltons and a degree of dispersion of 7.3, a weight average molecular weight of <math>2.4 \times 10^4</math> daltons and a degree of dispersion of 4.1, and a weight average molecular weights of <math>2.0 \times 10^4</math> daltons and a degree of dispersion of 3.6. This substance has significant antitumor effects against solid cancer.</p> <div data-bbox="649 1312 1364 1890"><p>IR SPECTRUM OF ANTITUMOR ACTIVE SUBSTANCE OF THE INVENTION 本発明の抗腫瘍活性物質のIRスペクトル</p></div>		

(57) 要約

ハラタケ属に属するカワリハラタケの子実体の熱水不溶でかつエタノール抽出残渣成分を5% 蔞酸アンモニウム水溶液で抽出し、抽出物を塩酸で分解後、ゲル濾過及びアフィニティークロマトグラフによる精製によって、ゲル濾過で測定した時の重量平均分子量  $3.8 \times 10^4$  ダルトンで分散度 2.3; 重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3; 重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1; 及び重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質が得られる。この物質は、固型癌に対して有意な抗腫瘍効果を発揮する。

P.C.T.に基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたP.C.T.加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GG	グンジャ	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
BS	バハマ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CG	コンゴ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボワール	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CN	中国	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
EE	エストニア	LS	レソト	SK	スロバキア		
ES	スペイン			SL	シエラレオネ		

## 明 細 書

## 抗腫瘍活性物質

## 5 技術分野

本発明は、抗腫瘍活性物質、それを含有する抗腫瘍剤及び健康食品に関する。  
更に詳細には、ハラタケ属に属するカワリハラタケの子実体のエタノール抽出残渣を集め、この残渣を酸分解し、更に精製して得ることのできる抗腫瘍活性物質、それを含有する抗腫瘍剤及び健康食品に関する。

## 10 背景技術

ハラタケ属に属するカワリハラタケ (Agaricus blazei Murill) は別名ヒメマツタケとも呼ばれ、主にブラジル東南部サンパウロ州の山地に自生し、昔から住民が食用にしていたキノコ的一种である。

近年、日本においてもカワリハラタケは栽培されるようになり、糖尿病や高血  
15 圧の治療に利用されてきた。

カワリハラタケから抗腫瘍活性を有する物質を探索する研究も多く行われており、例えばカワリハラタケの子実体あるいは菌子体を水性溶媒で抽出することにより抗腫瘍作用を有する多糖体が得られることが報告されている（特開昭55-74797号公報、特開昭64-67194号公報、特開昭64-67195号  
20 公報、特開昭55-108292号公報など）。また、ヒメマツタケの子実体から抗腫瘍作用を有する核酸成分が得られることも報告されている（特開昭64-66127号公報）。これらの抗腫瘍活性を有する物質は、いずれも水性溶媒あるいは熱水に可溶性成分から採取されたものである。

他方、特開平2-78630号公報には、カワリハラタケ子実体の熱水抽出残  
25 渣から抗腫瘍活性を有する蛋白多糖体が単離されたことが報告されている。即ち、カワリハラタケ子実体を熱水抽出処理して水溶性成分を除去し、得られる残渣を加熱した1%蔞酸アンモニウム水溶液で更に抽出処理して得られる残渣から抗腫瘍活性を有する蛋白多糖体が得られたことが報告されている。

上記した物質は、いずれも、水性溶媒あるいは熱水に可溶性成分から得られる

ものであるか、あるいは熱水抽出残渣から得られるものであって加熱した1%蔞酸アンモニウム水溶液には不溶な成分由来のものである。

一方、本発明者らは、カワリハラタケ子実体の熱水抽出残渣を加熱した1%蔞酸アンモニウム水溶液で抽出し、その抽出物から抗腫瘍作用を有する物質が得られることを見出し、特願平4-160924（特開平6-9423号公報）として特許出願した。

しかしながら、この物質は、固型癌の治療用に用いるための薬物としては、その抗腫瘍活性が十分に強いとは言い難いものである。

また、前記した、カワリハラタケ子実体の水性溶媒あるいは熱水に可溶な成分から得られる物質、及び熱水抽出残渣から得られるものであって加熱した1%蔞酸アンモニウム水溶液には不溶な物質のいずれも同様にその抗腫瘍活性が十分に強いとは言い難いものである。

#### 発明の開示

本発明者らはカワリハラタケの子実体を加熱したエタノールで処理し、抽出残渣を集め、この残渣を好ましくは蔞酸アンモニウムで抽出し得られた抽出物を、更に酸分解し、あるいは蔞酸アンモニウムで抽出処理することなく直接酸分解し、得られる酸分解物を精製することによって、強力な抗腫瘍活性を有する物質が得られ、この物質は抗腫瘍剤及び健康食品の成分として有用であることを見出し本発明を完成した。

本発明は、ハラタケ属に属するカワリハラタケの子実体の熱水不溶でかつエタノール不溶成分を酸分解して精製することによって得ることのできる、望ましくは該不溶成分を蔞酸アンモニウム水溶液で抽出して得られる抽出物を酸分解して精製することによって得ることのできる、ゲル濾過で測定した時の重量平均分子量 $3.8 \times 10^4$ ダルトンで分散度2.3；重量平均分子量 $2.9 \times 10^4$ ダルトンで分散度7.3；重量平均分子量 $2.4 \times 10^4$ ダルトンで分散度4.1；あるいは重量平均分子量 $2.0 \times 10^4$ ダルトンで分散度3.6の抗腫瘍活性物質に関する。

更に本発明は、上記抗腫瘍活性物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤に関する。

更に本発明は、上記抗腫瘍活性物質を有効成分として含有する健康食品に関する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、カワリハラタケの子実体から得られる酸分解処理品をゲル濾過に付したときのクロマトグラムのプロファイルを示す。

図 2 は、図 1 に示したゲル濾過により得られる高分子成分をアフィニティークロマトグラフィー（DEAE分画）に付したときのプロファイルを示す。

図 3 は、図 2 に示したゲル濾過により得られる低分子成分をアフィニティークロマトグラフィー（DEAE分画）に付したときのプロファイルを示す。

10 図 4 は、本発明の抗腫瘍活性物質をゲル濾過に付したときのクロマトグラムのプロファイルを示す。

図 5 は、本発明の抗腫瘍活性物質の IR スペクトルを示す。

図 6 は、本発明の抗腫瘍活性物質の NMR 一次元スペクトルを示す。

図 7 は、マウスの右下腹部に接種した腫瘍 Me t h - A に対する本発明の抗腫瘍活性物質の抗腫瘍活性効果を示す。

図 8 は、マウスの左下腹部に接種した腫瘍 Me t h - A に対する本発明の抗腫瘍活性物質の抗腫瘍活性効果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

ハラタケ属に属するカワリハラタケは、既に広く知られているが、工業技術院微生物工業研究所に受託番号、微工研菌寄第 4 7 3 1 号として寄託されている。

勿論、寄託品以外の公知のカワリハラタケを本発明では用いることもできる。

カワリハラタケの子実体から本発明の抗腫瘍活性物質を得るには以下の方法が採用される。

子実体は生の子実体あるいは乾燥した子実体のいずれでもよく、通常、生の子実体の場合には千切りにしたものが、乾燥品の場合にはよく粉碎したものが用いられる。

まず、子実体を加熱した 7 5 ~ 9 0 %、望ましくは 8 0 ~ 8 5 %、例えば 8 0 % エタノールで処理して可溶性成分を除去して残渣を集める。この場合の温度は通常 8 0 °C 程度であり、その処理時間は処理量などにもよるが通常 6 時間 ~ 2 4

時間、望ましくは18～22時間程度である。尚、このような処理により低分子有機化合物成分が除去される。

- 次いで、得られた残渣を熱水で処理して熱水に可溶な成分を除去して、再び残渣を集める。これにより、熱水可溶性中性及び酸性多糖類が除去される。ここで
- 5 用いる熱水の温度は通常80～100℃である。処理時間は通常6時間～24時間、望ましくは18～22時間である。

- 次いで、集めた残渣を凍結乾燥して、次の酸分解工程に付すことができる。好ましくは集めた残渣を加熱した1%～5%、望ましくは5%蔞酸アンモニウム水溶液で抽出し、蔞酸アンモニウム水溶液に可溶な成分を回収する。蔞酸アンモニウム水溶液は通常煮沸した状態にて抽出処理を行う。かくして回収された可溶成分を集めて濃縮し、濃縮後蔞酸アンモニウムを限外濾過により脱塩濃縮して凍結乾燥する。
- 10

- 次いでこの凍結乾燥品を酸分解する。酸分解に用いる酸としては、塩酸、硫酸、硝酸などの強酸が好ましく、特に塩酸が好ましい。具体的には、例えば、1N塩
- 15 酸に凍結乾燥品を溶解し、室温にて1晩放置することによって酸分解を実施することができる。

酸分解後、例えば、1N水酸化ナトリウム水溶液で中和し、得られる水溶液を遠心分離して不要物を除去し、上清を限外濾過膜で脱塩濃縮し、凍結乾燥し、次いで精製工程に付す。

- 20 得られる酸分解物の凍結乾燥品の精製は、ゲル濾過及びアフィニティークロマトグラフィーにより達成できる。ゲル濾過は、例えばGPCカラム、TSK gel G 5000PWとTSK gel G 3000PW（各21.5mm×300mm、東ソー社製）を連結したものなどを用いることによって実施できる。ゲル濾過によって、酸分解物を、分子量 $10^5 \sim 10^6$ ダルトン前後の高
- 25 分子画分、及び分子量 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ ダルトン前後の低分子画分に分離する。

次いで、得られる高分子画分及び低分子画分を、それぞれアフィニティークロマトグラフィーに付して精製することによって、本発明のゲル濾過で測定した時の重量平均分子量 $2.9 \times 10^4$ ダルトンで分散度7.3の抗腫瘍活性物質、及び

ゲル濾過で測定した時の重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1 の抗腫瘍活性物質並びに重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質を、それぞれ高分子画分及び低分子画分から得ることができる。

アフィニティークロマトグラフィーは、例えば DEAE カラム、TSK gel  
5 DEAE-5PW (21.5 mm × 150 mm × 2 : 東ソー社製) などを用いること  
によって実施できる。本発明の重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度  
7.3 の抗腫瘍活性物質は、DEAE カラムに上記の高分子画分を吸着させ、次  
いで 0.5 M NaCl 水溶液で溶出することによって得られる。重量平均分子  
量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1 の抗腫瘍活性物質は、DEAE カラム  
10 に上記の低分子画分を吸着させ、次いで 0.2 M NaCl 水溶液で溶出するこ  
とにより、また重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍  
活性物質は 0.5 M NaCl 水溶液で溶出することによって得られる。

本発明の重量平均  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 の抗腫瘍活性物質は、  
アイボリーホワイト、綿状で強吸湿性で、水に可溶性であるという性質を有して  
15 いる。重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1 並びに重量平均分  
子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質は、褐色、吸湿性  
で水に可溶性であるという性質を有している。

重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 の抗腫瘍活性物質は、U  
V 280 nm でわずかに吸収が認められることからその組成は主に多糖体からな  
20 るか一部若干蛋白多糖体であると考えられる。重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダ  
ルトンで分散度 4.1 の抗腫瘍活性物質は、UV 280 nm でわずかに吸収を示  
すことからほとんど多糖体より成り、重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで  
分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質は UV 280 nm で相当程度の吸収が認められる  
ことから大部分は蛋白より構成されその一部に多糖体が結合している複合体と考  
25 えられる。

本発明の重量平均分子量  $3.8 \times 10^4$  ダルトンで分散度 2.3 の抗腫瘍活性物  
質は、上記した重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 の抗腫瘍活  
性物質を更に上記したと同様に例えば GPC カラムなどを用いたゲル濾過により  
精製し、脱塩濃縮することによって得ることができる。

本発明の重量平均  $3.8 \times 10^4$  ダルトンで分散度 2.3 の抗腫瘍活性物質は、アイボリーホワイト、綿状で強吸湿性で、水に可溶性であるという性質を有している。 $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$  の測定により、本発明の抗腫瘍活性物質の一次元スペクトルのアノメリックプロトン領域をみると、5.27 ppm と 4.51 ppm にピークがみられる。5.27 ppm のピークは 1-4- $\alpha$ -グルカン、4.51 ppm のピークは 1-6- $\beta$ -グルカンであることを示しており、NMR ピークの積分値から 1-4- $\alpha$ -グルカン、1-6- $\beta$ -グルカンの存在比は 4 : 1 である。従って、本発明の抗腫瘍活性物質は主として 1-4- $\alpha$ -グルカンと 1-6- $\beta$ -グルカンから構成される多糖体である。また、本発明の抗腫瘍活性物質の IR の測定では  $881\text{ cm}^{-1}$  に吸収がある。比旋光度

$$[\alpha]_D^{20} + 121^\circ$$

である。

本発明の抗腫瘍活性物質は、例えば腺維芽肉色腫由来の Meth-A に対して強力な抗腫瘍作用を示す。Meth-A は一般の固型癌の中でもっとも化学療法剤に抵抗性を有することが知られたものであり [Biotherapy, 3 (2), 557 (1989); Biotherapy, 4 (4) 915 (1990); 癌と化学療法, 18 (11) 1812 (1991)]、従って本発明の物質は他の固型癌に対しても十分に有効なものと期待できる。

本発明の抗腫瘍活性物質は、治療に適用する場合には、経口投与あるいは注射による投与が採用される。経口投与の場合の剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤などが挙げられ、これらは通常の方法により調製することができる。注射剤も通常用いられる注射用ビークルに抗腫瘍活性物質を溶解もしくは分散させる通常の方法によって調製することができる。

本発明の抗腫瘍活性物質の投与量は、腫瘍の種類、投与ルートなどによって変動するが、通常  $5 \sim 100\text{ mg/体重kg}$  である。

また、本発明の抗腫瘍活性物質は、健康食品の有効成分として用いることもできる。健康食品として用いる場合には乾燥原料を前記した方法で精製し、凍結乾燥品とした後、既存の食品に一定の割合にて配合し、食品とする。例えば、その凍結乾燥品を含んだふりかけとして、あるいはティーパックやカプセルに調製し



て用いることができる。また、その凍結乾燥品あるいは濃縮液を、乳製品、油脂製品、調味料、菓子、果実ジュース、清涼飲料等に添加して用いることもできる。これらに用いる場合の本発明の抗腫瘍活性物質の添加量は、通常、健康食品中に0.001～0.1重量%含有する量である。

- 5   ハラタケ属に属するカワリハラタケの子実体の熱水不溶でかつエタノール不溶成分からの1～5%蔞酸アンモニウム水溶液抽出物を酸分解し、次いで精製することによって、固型癌に対して強い抗腫瘍活性を有する物質を得ることができる。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

#### 実施例1.

10

#### 抗腫瘍活性物質の製造

(1) ヒメマツタケ乾燥子実体30kgを粗粉碎(5mm以下)する。子実体30kgに80% $\nu/\nu$ 、エタノール270リットルを加え、加熱還流下22時間抽出し、固液分離をした後、残渣に80% $\nu/\nu$ 、エタノール270リットルを加えて上記と同様に処理し、これを3回繰り返した。

- 15 (2) 上記(1)の抽出残渣に精製水270リットルを加え、加熱還流下22時間抽出し、固液分離をした。その後、残渣に精製水270リットルを加えて上記と同様に処理し、これを3回繰り返した。

(3) 上記(2)の抽出残渣に5%蔞酸アンモニウム水270リットルを加え、加熱還流下22時間抽出した。固液分離後、3液を濃縮した。残渣に5%蔞酸アンモ

- 20 ニウム水270リットル加え、上記と同様に処理し、これを3回繰り返した。全抽出液800リットルを濃縮して80～100リットルとした。

(4) この溶液を濾紙で濾過し、限外濾過膜(分画分子量10000)で脱塩濃縮した。凍結乾燥したものを1N HClに溶解し、24時間放置し、その後1N

- 25 NaOH水溶液にて中和しpH7とした。遠心分離で不要物を切除し、上清を限外濾過膜(分画分子量10000)で脱塩濃縮し、凍結乾燥した。

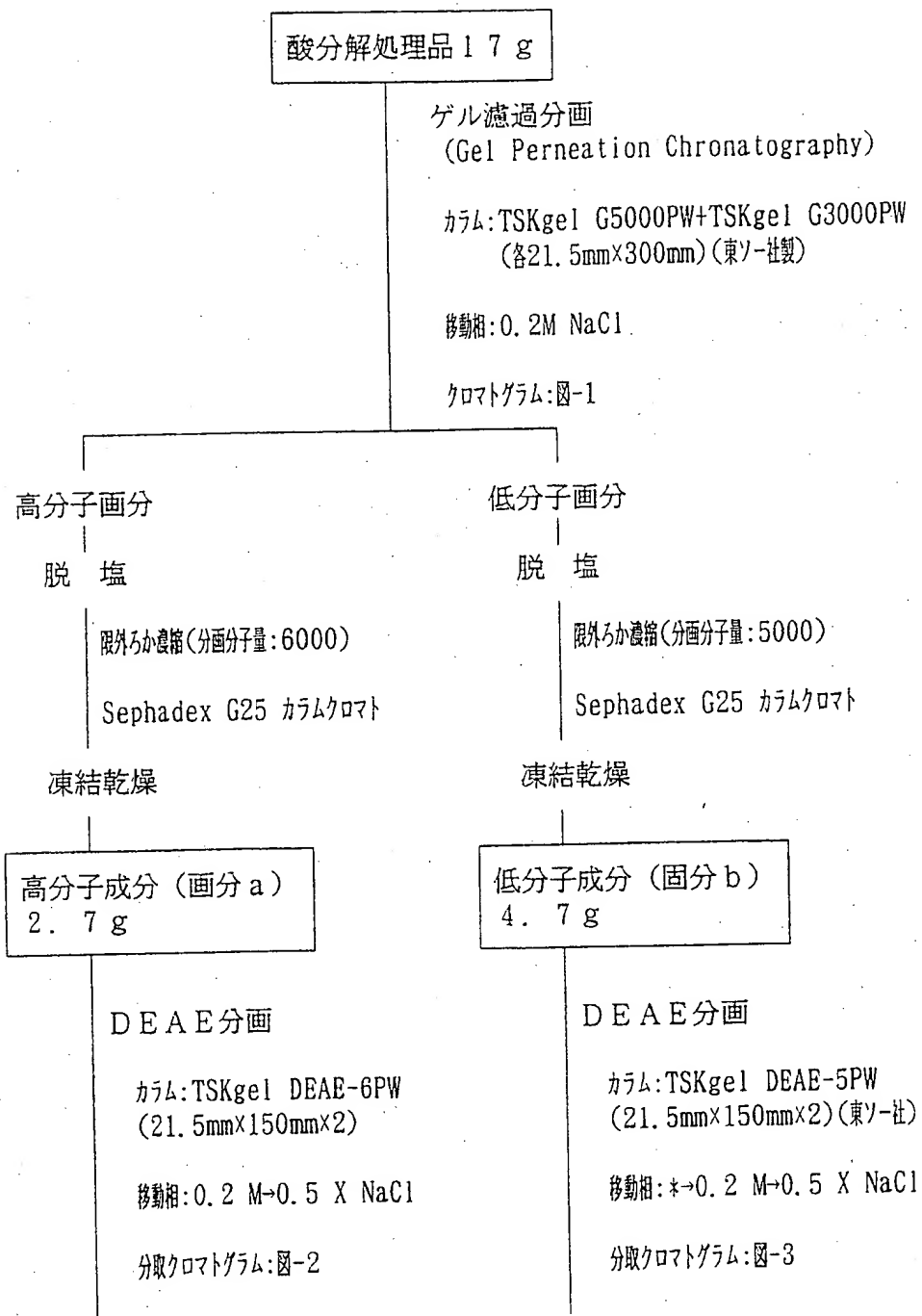
(5) 上記(4)の酸分解処理後、精製した乾燥粉末を10mg/mlの割合で0.2M

NaClで溶解した。溶解後遠心分離し、溶解上清を0.8 $\mu$ mのmembrane filterで濾過した。

上記濾過上清をゲル濾過カラム(TSK gel G 5000PW+

- TSK gel G 3000PW; 各5mm×30mm、連結カラム) にかけて、溶解した成分をRI (示差屈折率計) にて高分子画分及び低分子画分を得た。この各画分を限外濾過 (分画分子量5000) にて脱塩し、濃縮した。高分子濃縮画分をDEAEカラム (TSK gel DEAE-5PW) にかけて、0.2M NaClにて溶出したものを除去後0.5M NaClで溶出し、限外濾過にて脱塩したものを凍結乾燥濃縮後、水溶液としその可溶性物質に強い抗腫瘍活性を認めた。又低分子濃縮画分を同種のカラムにかけて、水で溶解したものを除去し、0.2M NaClと0.5M NaClで溶出したものを限外濾過にて脱塩し、他と同じように調製した水溶液に強い抗腫瘍活性を認めた。
- 10 更に上記高分子濃縮画分の精製物を上記したと同様にしてゲル濾過カラムにかけて、溶出部を限外濾過にて脱塩し、濃縮した。この物質はさらに強い抗腫瘍活性を示した。
- (6) 上記(5) の工程を、以下の表1に更に具体的に示した。表1に示した、酸分解処理後、ゲル濾過により得られる高分子成分(a) 及び低分子成分(b) を更にア
- 15 フィニティークロマトグラフィーに付して得られる高分子成分a-3、低分子成分b-2及びb-3、並びに高分子成分a-3を更にゲル濾過カラムに付して得られるH-3精製品が本発明の抗腫瘍活性物質である。

表 1



9 / 1

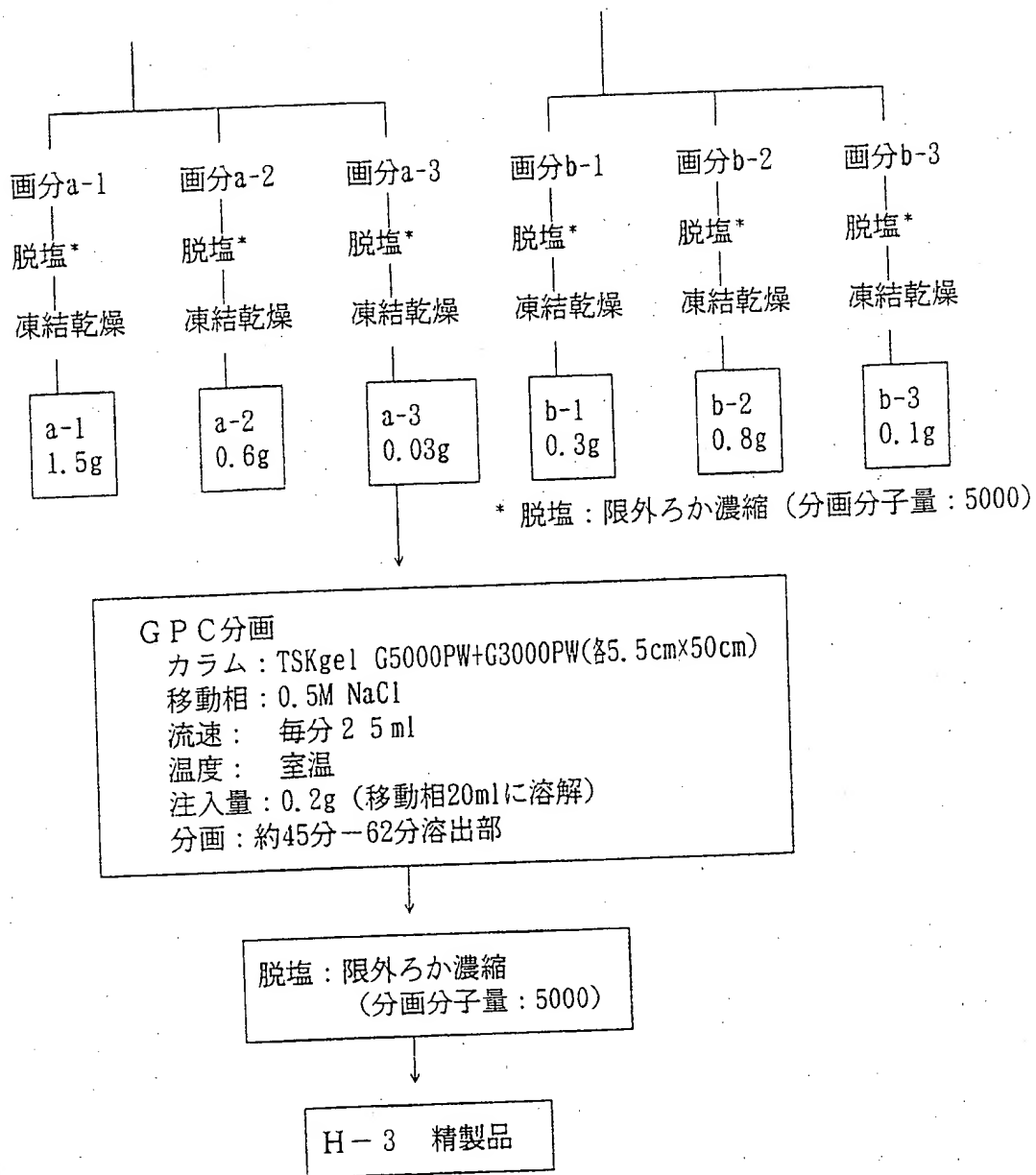


表1に示されているように、図-1にゲル濾過（GPC分画）によるクロマトグラムのプロファイルを示す。図-2及び図-3に、ゲル濾過により得られる高分子画分及び低分子画分を、アフィニティークロマトグラフィー（DEAE分画）に付した時のプロファイルをそれぞれ示す。

- 5 表1に示した高分子成分a-3を更にゲル濾過（GPC分画）に付してH-3精製品を得た時のGPC分画によるクロマトグラムのプロファイルを図4に示す。
- (7) 表1に示されている酸分解処理品、ゲル濾過により得られる高分子成分(a)及び低分子成分(b)、更にアフィニティークロマトグラフィーにより得られる高分子成分a-1、a-2及びa-3、低分子成分b-1、b-2及びb-3、更にH-3精製品について、ゲル濾過分析を行った。その結果を表2に示す。

表-2 ゲル濾過分析結果

成分名	数平均分子量	重量平均分子量	分散度	ピーク頂点
酸分解処理品	$0.8 \times 10^4$	$17 \times 10^4$	20	$27 \times 10^4$ , $1.3 \times 10^4$
高分子成分 (a)	$10 \times 10^4$	$35 \times 10^4$	3.4	$31 \times 10^4$
15 低分子成分 (b)	$0.3 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	8.0	$1.2 \times 10^4$
高分子成分				
a-1	$18 \times 10^4$	$39 \times 10^4$	2.4	$35 \times 10^4$
a-2	$8.2 \times 10^4$	$28 \times 10^4$	3.2	$26 \times 10^4$
a-3	$4.0 \times 10^4$	$29 \times 10^4$	7.3	$32 \times 10^4$
低分子成分				
b-1	$0.8 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	3.0	$0.7 \times 10^4$
b-2	$0.6 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	4.1	$1.7 \times 10^4$
b-3	$0.8 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	3.8	$1.7 \times 10^4$
20 H-3 精製品	$17 \times 10^4$	$38 \times 10^4$	2.3	$30 \times 10^4$

ゲル濾過分析条件

カラム：TSKgel G5000PW+TSKgel G3000PW (各21.5mm×300mm)

検出：RI

25 カラム温度：40℃

移動相：50mM 硝酸ナトリウム

流速：0.5ml/分

注入量：200μl (約1mg/ml、移動相)

分子量校正：プルラン

(Shodex:  $0.58 \times 10^4$ 、 $1.22 \times 10^4$ 、 $2.37 \times 10^4$ 、  
 $4.80 \times 10^4$ 、 $10.0 \times 10^4$ 、 $18.6 \times 10^4$ 、  
 $38.6 \times 10^4$ 、 $85.3 \times 10^4$ )

5 本発明の重量平均分子量  $29 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 の抗腫瘍活性物質は、表-1 及び表-2 の高分子成分 a-3 に相当し、本発明の重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1 並びに重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質は、表-1 及び表-2 の低分子成分 b-2 及び b-3 に相当する。

10 本発明の重量平均分子量  $38 \times 10^4$  ダルトンで分散度 2.3 の抗腫瘍活性物質は、表-1 及び表-2 の高分子成分 a-3 を更にゲル濾過精製し、脱塩濃縮して得られる H-3 精製品に相当する。

(8) 本発明の H-3 精製品について、KBr 錠剤法によって IR の測定を行った。得られる IR のスペクトルを図 5 に示した。得られたスペクトルには、 $881 \text{ cm}^{-1}$  に吸収があり、これは B-D-グルコピラノ結合に由来するものと思われる。  
 15 る。

また、H-3 精製品について、BRUKER 社の AC-300P により NMR の一次元スペクトル ( $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR) を測定した。測定温度は  $298 \text{ K}$  であった。得られる一次元スペクトルを図 6 に示した。一次元スペクトルでは、プロトン領域をみると、 $5.27 \text{ ppm}$  と  $4.51 \text{ ppm}$  にピークがみられ、文献値 (Agric. Biol. Chem., 54, 2889 (1990))  
 20 から、 $5.27 \text{ ppm}$  のピークは 1-4- $\alpha$ -グルカン、 $4.51 \text{ ppm}$  のピークは 1-6- $\beta$ -グルカン由来のピークであると考えられる。積分値から、1-4- $\alpha$ -グルカン、1-6- $\beta$ -グルカンの存在比は 4:1 であると思われる。

更には、H-3 精製品について、ナトリウムスペクトルの D 線を用い、温度  $25^\circ\text{C}$ 、層長  $50 \text{ mm}$ 、濃度 1%、1% 水酸化ナトリウム水溶液で施光度を測定した。  
 25 その結果、比施光度

$$[\alpha]^\circ$$

は  $+121^\circ$  であった。

(9) H-3 精製品について、フェノール硫酸法を用いて全糖の測定を行った結果、

H-3 精製品の糖含量 (%) は 90.0 % であった。

また、H-3 精製品について、試料 (5 mg) を 2 M-トリフルオロ酢酸 (2 ml) で加水分解 (100 °C、3 時間) し、減圧留去後アミノカラム [CAPCELL PAK NH<sub>2</sub> (4.6 mm × 250 mm)] を用いて構成糖の測定を行った。そ

5 の結果、グルコースのみが検出された。

(10) H-3 精製品について、ローリー法を用いて、タンパク含量の測定を行った。標準品は牛製アルブミンを使用した。その結果、タンパク含量 (%) は 3.4 % であった。

また、H-3 精製品の 8 mg を 6 N-塩酸 (2 ml) で加水分解 (110 °C、22  
10 時間) し、HPLC (日立、L-8500 形アミノ酸分析計) を用いて構成アミノ酸の測定を行った。結果を表 3 に示す。

(Shodex:  $0.58 \times 10^4$ 、 $1.22 \times 10^4$ 、 $2.37 \times 10^4$ 、  
 $4.80 \times 10^4$ 、 $10.0 \times 10^4$ 、 $18.6 \times 10^4$ 、  
 $38.6 \times 10^4$ 、 $85.3 \times 10^4$ )

本発明の重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 の抗腫瘍活性物質は、表-1 及び表-2 の高分子成分 a-3 に相当し、本発明の重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1 並びに重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質は、表-1 及び表-2 の低分子成分 b-2 及び b-3 に相当する。

本発明の重量平均分子量  $3.8 \times 10^4$  ダルトンで分散度 2.3 の抗腫瘍活性物質は、表-1 及び表-2 の高分子成分 a-3 を更にゲル濾過精製し、脱塩濃縮して得られる H-3 精製品に相当する。

(8) 本発明の H-3 精製品について、KBr 錠剤法によって IR の測定を行った。得られる IR のスペクトルを図 5 に示した。得られたスペクトルには、 $881 \text{ cm}^{-1}$  に吸収があり、これは B-D-グルコピラノ結合に由来するものと思われる。

また、H-3 精製品について、BRUKER 社の AC-300P により NMR の一次元スペクトル ( $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ ) を測定した。測定温度は  $298 \text{ K}$  であった。得られる一次元スペクトルを図 6 に示した。一次元スペクトルでは、プロトン領域をみると、 $5.27 \text{ ppm}$  と  $4.51 \text{ ppm}$  にピークがみられ、文献値 (Agric. Biol. Chem., 54, 2889 (1990)) から、 $5.27 \text{ ppm}$  のピークは  $1-4-\alpha$ -グルカン、 $4.51 \text{ ppm}$  のピークは  $1-6-\beta$ -グルカン由来のピークであると考えられる。積分値から、 $1-4-\alpha$ -グルカン、 $1-6-\beta$ -グルカンの存在比は 4 : 1 であると思われる。

更には、H-3 精製品について、ナトリウムスペクトルの D 線を用い、温度  $20^\circ\text{C}$ 、層長  $50 \text{ mm}$ 、濃度 1%、1% 水酸化ナトリウム水溶液で施光度を測定した。その結果、比施光度

$$[\alpha] \%$$

は  $+121^\circ$  であった。

(9) H-3 精製品について、フェノール硫酸法を用いて全糖の測定を行った結果、



H-3 精製品の糖含量 (%) は 90.0 % であった。

また、H-3 精製品について、試料 (5 mg) を 2 M-トリフルオロ酢酸 (2 ml) で加水分解 (100 °C、3 時間) し、減圧留去後アミノカラム [CAPCELL PAK NH<sub>2</sub> (4.6 mm × 250 mm)] を用いて構成糖の測定を行った。その結果、グルコースのみが検出された。

(10) H-3 精製品について、ローリー法を用いて、タンパク含量の測定を行った。標準品は牛製アルブミンを使用した。その結果、タンパク含量 (%) は 3.4 % であった。

また、H-3 精製品の 8 mg を 6 N-塩酸 (2 ml) で加水分解 (110 °C、22 時間) し、HPLC (日立、L-8500 形アミノ酸分析計) を用いて構成アミノ酸の測定を行った。結果を表 3 に示す。

12/1

表 3 : アミノ酸組成

	組成比 ( % mol/mol )
	H-3 精製品
Asx	10.4
Thr	5.7
Ser	7.6
Glx	11.4
Gly	9.3
Ala	10.3
Val	6.6
(Cys) 2	0.3
Met	1.2
Ile	5.0
Leu	9.3
Tyr	1.8
Phe	4.0
Lys	5.4
His	1.6
Arg	4.5
Pro	5.6
合計	100.0

尚、検出されたグルコサミン含量 ( % ) は 0.06 % であった。

## 実施例 2

### 25 抗腫瘍活性の測定

Meth-A (悪性黒色腫由来) をマウス (1群5匹、Balb/c、雄6週齢) の右 ( $1 \times 10^6$ ) および左下腹部 ( $2 \times 10^5$ ) の皮下に同時に接種し、その接種後3日目、4日目、5日目に、実施例1で得られた本発明の抗腫瘍活性物質、高分子成分a-3、低分子成分b-2及びb-3それぞれ乾燥重量1mg/

- 5 マウスの割合で同じ場所の右下腹部腫瘍内 (左下腹部腫瘍内には抽出物は注射しない) に、生理食塩水に溶解させて注射した。また対照として別のマウス群に生理食塩水を右下腹部腫瘍内に上記スケジュールで同じように注射した (control)。更には、効果比較のために精製前の酸分解処理品を別のマウス群の右腫瘍内に上記スケジュールで注射した。

- 10 腫瘍接種後21日まで右下腹部及び左下腹部の腫瘍の大きさ (面積) および重量を一定の時期に測定し、実施例1で得られた抽出物の効果を見た。

表4及び5には腫瘍接種後21日目の実験結果を示す。

表4：高分子成分の抗腫瘍効果

		tumor free	Tumor Size	%	Tumor Weight	%
		<u>/Total</u>	<u>(mm<sup>2</sup>)</u>	<u>inhibition</u>	<u>(g±S. D.)</u>	<u>inhibition</u>
5						
	高分子成分	Right 0/5	242.4±97.37 *	52.6	1.4 ±0.65	60.0
	a-1					
		Left 0/5	105.2±93.26 *	63.0	0.5 ±0.57	68.8
10	高分子成分	Right 1/5	96.0±162.72 *	61.6	1.3 ±1.12	62.9
	a-2					
		Left 2/5	114.8±132.82 *	56.9	0.7 ±0.92	56.3
	高分子成分	Right 3/5	25.4±31.11 *	95.1	0.1 ±0.15	97.1
15	a-3					
		Left 3/5	25.2±35.27 *	91.1	0.6 ±0.44	62.5
	酸分解処理品	Right 0/5	265.0±71.27 *	48.0	1.6 ±0.57	53.3
		Left 0/5	149.2±82.64 *	47.6	0.8 ±0.45	50.0
20						
	Control	Right 0/5	510.0±58.74 *	N/A	3.5 ±0.52	N/A
		Left 0/5	284.4±70.39 *	N/A	1.6 ±0.32	N/A

\*Control に対して\* P<0.01で有意差あり\*\*P<0.05有意差あり

表5：低分子成分の抗腫瘍効果

	tumor free /Total	Tumor Size (mm <sup>2</sup> )	% inhibition	Tumor Weight (g± S.D.)	% inhibition
5	低分子成分 Right 0/5	470.2±125.34+	5.3	3.1±1.03	16.2
	b-1 Left 0/5	271.4±87.90 *	17.1	1.9±1.19	24.0
	低分子成分 Right 1/5	131.8±75.11 *	73.4	0.7±0.39	81.0
	b-2 Left 1/5	143.2±111.42*	56.3	0.9±0.68	64.0
10	低分子成分 Right 1/5	81.4±45.78 *	83.6	0.5±0.27	86.5
	b-3 Left 1/5	115.6±117.33*	64.7	0.7±0.82	72.6
	酸分解処理品 Right 0/5	288.8±164.75*	41.8	1.9±1.24	48.6
	Left 3/5	74.4±91.20 *	77.3	0.3±0.50	88.0
15	Control Right 0/5	496.4±104.22	N/A	3.7±0.75	N/A
	Left 0/5	327.4±51.91	N/A	2.5±0.76	N/A

\* Control に対して      \* P<0.01 で有意差あり      + P<0.05 で有意差なし

表-4及び表-5の結果から、本発明の高分子成分a-3、低分子成分b-2  
20 及びb-3は、強い抗腫瘍効果を示すことが明らかである。また対照と比較して、成分を注射しない左側腫瘍も縮小することから、本発明の成分には宿主の免疫相当細胞を活性化させ、免疫機能活性化により抗腫瘍活性が発揮されることも明らかになった。

### 実施例3

#### 25 抗腫瘍活性の測定

Meth-A (fibrosarcoma; 線維芽肉腫) をマウス (1群5匹、BALB/c、6週齢雄) の右 ( $1 \times 10^6$ ) および左下腹部 ( $2 \times 10^5$ ) の

- 皮下に同時に接種し、その接種後3日目、4日目、5日目に実施例1で得られた本発明の抗腫瘍活性物質（H-3精製品）および別のマウス群に効果比較のために精製前の酸分解処理品を右下腹部腫瘍内に上記スケジュールで注射した。又、対照として別のマウス群に生理食塩水を右下腹部腫瘍内に上記スケジュールで注射した。腫瘍接種後21日まで右下腹部および左下腹部の腫瘍の大きさ（面積； $\text{mm}^2$ ）を一定の時期に測定し、実施例1で得られた抽出物の効果を見た。更に、21日目に動物を殺し、腫瘍の重量（g）を測定した。表6に21日目の腫瘍の重量を測定した結果及び大きさをまとめたものを示した。図7および図8には腫瘍接種後21日目までの右下腹部および左下腹部のそれぞれの実験結果を示す。
- 表6、図7および図8から明らかな様に、本発明の抗腫瘍活性物質は、Meth-A腫瘍に対し強力な抗腫瘍活性を示す。

表6

抗腫瘍活性物質	Tumor free /Total	Tumor Size ( $\text{mm}^2 \pm \text{S.D.}$ )	% inhibition	Tumor Weight ( $\text{g} \pm \text{S.D.}$ )	% inhibition
Right	5/5	$0 \pm 0$ **	100.0	$0 \pm 0$ **	100.0
H-3精製品					
Left	4/5	$2.4 \pm 4.80$ **	98.2	$<0.1$ ***	$\leq 100.0$
Right	0/5	$125.4 \pm 77.55$ **	55.7	$0.8 \pm 0.56$ **	70.4
酸分解処理品					
Left	2/5	$55.6 \pm 56.95$ ***	58.8	$0.3 \pm 0.30$ **	70.0
Right	0/5	$282.8 \pm 88.38$	N/A	$2.7 \pm 1.15$	N/A
コントロール					
Left	0/5	$135.0 \pm 57.12$	N/A	$1.0 \pm 0.52$	N/A

\*  $P < 0.01$  VS Control

\*\*  $P < 0.01$  VS Control

\*\*\*  $P < 0.05$  VS Control

+  $P < 0.01$  VS 酸分解フラクション3

5 ++  $P < 0.05$  VS 酸分解フラクション3

N/A; not applicable

#### 実施例 4

##### 錠剤の製造

実施例 1 で得られる本発明の抗腫瘍活性物質（高分子成分 a-3）100 g、  
10 マンニトール 100 g 及びブドウ糖 100 g を混合し、通常の成形機にて錠剤化する。

#### 実施例 5

##### 錠剤の製造

実施例 1 で得られる本発明の抗腫瘍活性物質（H-3 精製品）100 g、マン  
15 ニトール 100 g 及びブドウ糖 100 g を混合し、通常の成形機にて錠剤化する。

#### 実施例 6

##### 健康食品の製造

実施例 1 で得られる本発明の抗腫瘍活性物質（高分子成分 a-3）を 1 mg を  
含む水溶液 1 リットルを適量のデキストリンに加え攪拌しながら基材に吸着させ  
20 る。

この粉末を押し出し顆粒機にかけ、網目 1 mm にて粉末を押し出して顆粒化し、  
受けに 12 mesh の篩を用いて篩い分けする。

得られる顆粒を乾燥機に入れ 6.0 °C で一晩乾燥させ、これにより水分約 3 % の  
顆粒ができる。この顆粒は、お茶などの飲物用添加物として用いられる。

#### 25 実施例 7

##### 健康食品の製造

実施例 1 で得られる本発明の抗腫瘍活性物質（H-3 精製品）を 1 mg を含む  
水溶液 1 リットルを適量のデキストリンに加え攪拌しながら基材に吸着させる。

この粉末を押し出し顆粒機にかけ、網目 1 mm にて粉末を押し出して顆粒化し、

受けに12 meshの篩を用いて篩い分けする。

得られる顆粒を乾燥機に入れ60℃で一晩乾燥させ、これにより水分約3%の顆粒ができる。この顆粒は、お茶などの飲物用添加物として用いられる。

#### 産業上の利用可能性

- 5 ハラタケ属に属するカワリハラタケの子実体の熱水不溶でかつエタノール不溶成分を酸分解し、望ましくは、該不溶成分を蔞酸アンモニウム水溶液にて抽出しその抽出物を酸分解し、次いで精製することによって、固型癌に対して強い抗腫瘍活性を有する物質を得ることができる。

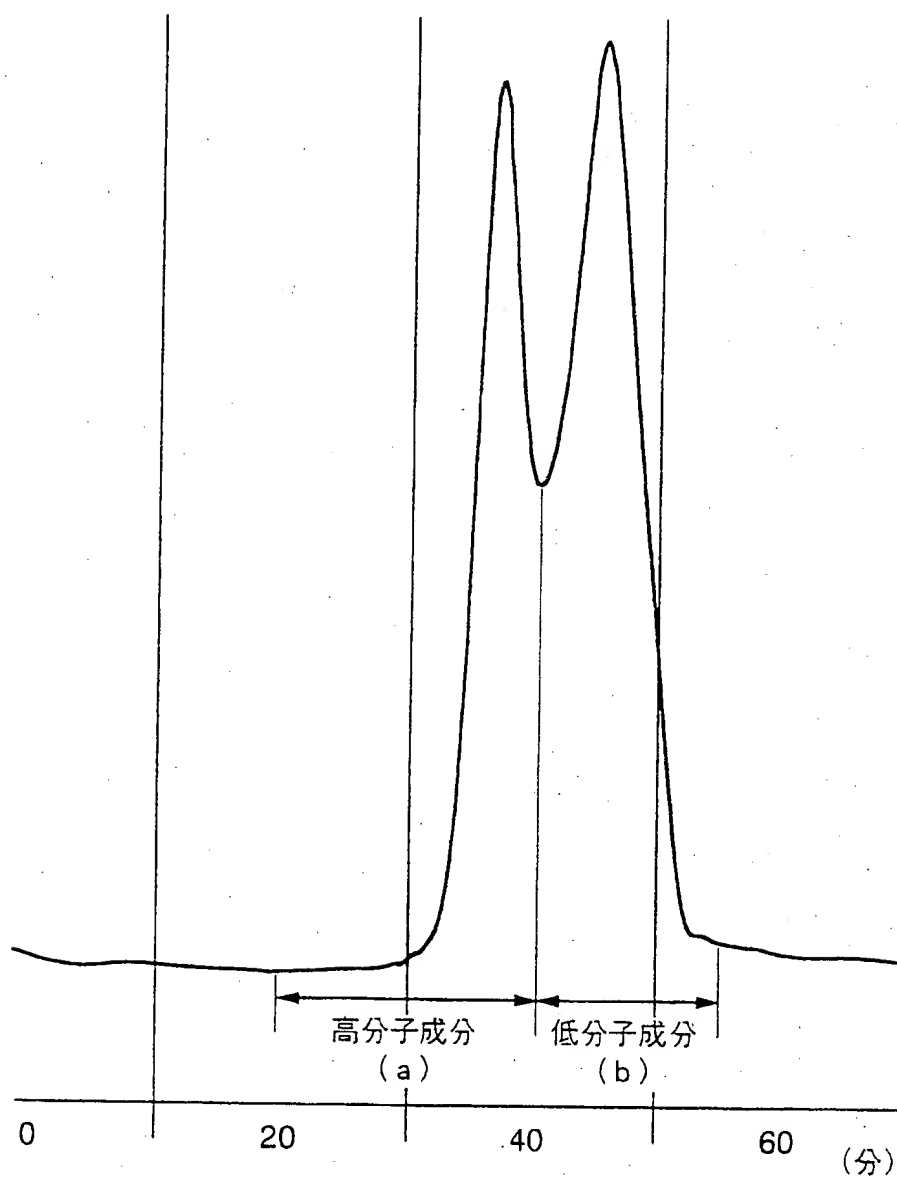


## 請求の範囲

1. ハラタケ属に属するカワリハラタケの子実体の熱水不溶でかつエタノール不溶成分を酸分解して精製することによって得ることのできる、ゲル濾過で測定した時の重量平均分子量  $3.8 \times 10^4$  ダルトンで分散度 2.3 ; 重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 ; 重量平均分子量  $2.4 \times 10^4$  ダルトンで分散度 4.1 ; あるいは重量平均分子量  $2.0 \times 10^4$  ダルトンで分散度 3.6 の抗腫瘍活性物質。
2. 該子実体の熱水不溶でかつエタノール不溶成分を蔞酸アンモニウム水溶液で抽出して得られる抽出物を酸分解して精製することによって得ることのできる請求の範囲 1 の抗腫瘍活性物質。
3. 酸分解後に、ゲル濾過、次いでアフィニティークロマトグラフィーによって精製することによって得ることのできる請求の範囲 1 または 2 の抗腫瘍活性物質。
4. 重量平均分子量  $2.9 \times 10^4$  ダルトンで分散度 7.3 の抗腫瘍活性物質は、主として 1-4- $\alpha$ -グルカンと 1-6- $\beta$ -グルカンから構成されており、それらの存在比が 4 : 1 である請求の範囲 1 から 3 のいずれかの抗腫瘍活性物質。
5. 請求の範囲 1 から 4 のいずれかの抗腫瘍活性物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤。
6. 請求の範囲 1 から 4 のいずれかの抗腫瘍活性物質を有効成分として含有する健康食品。

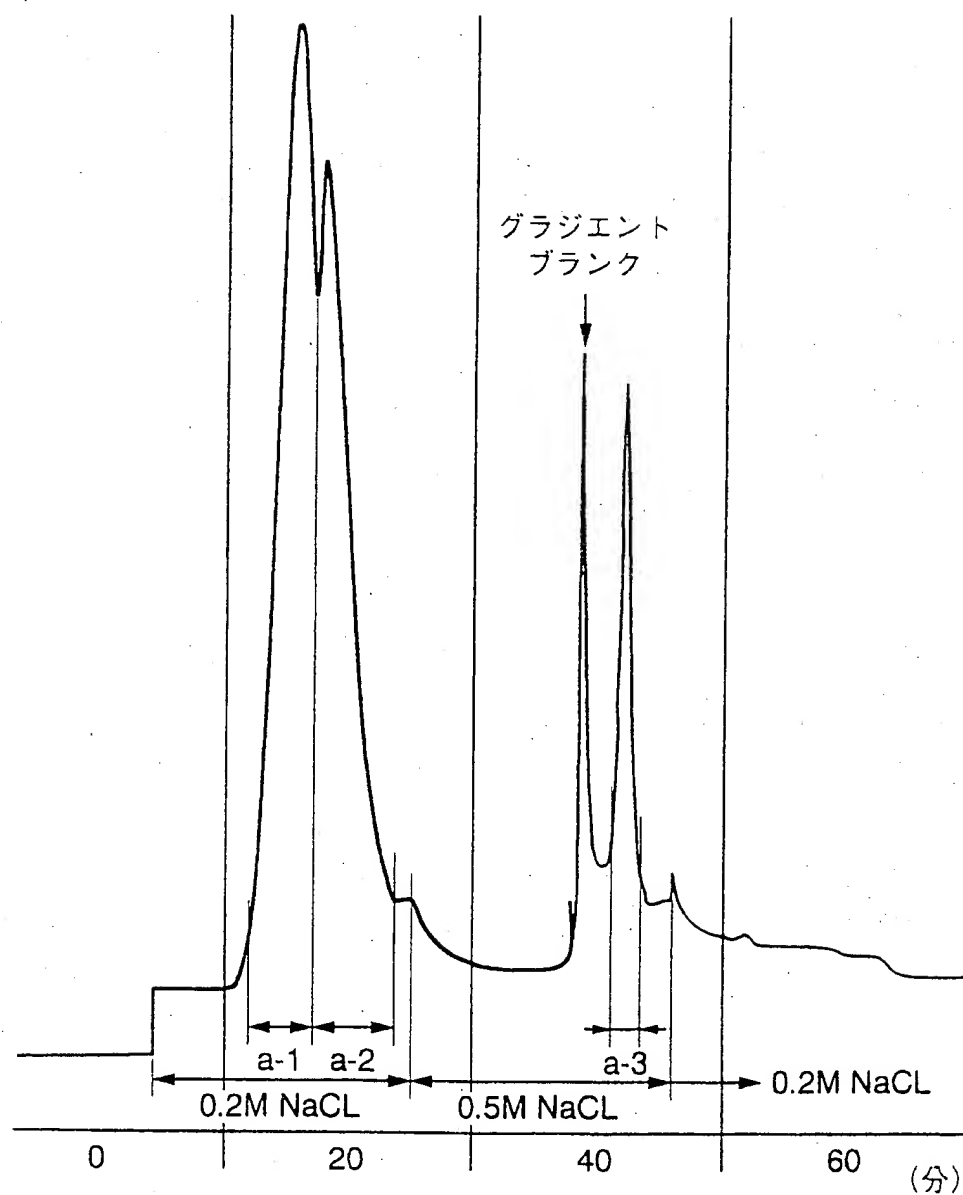
1 / 8

FIG.1



酸分解処理品のGPC分画

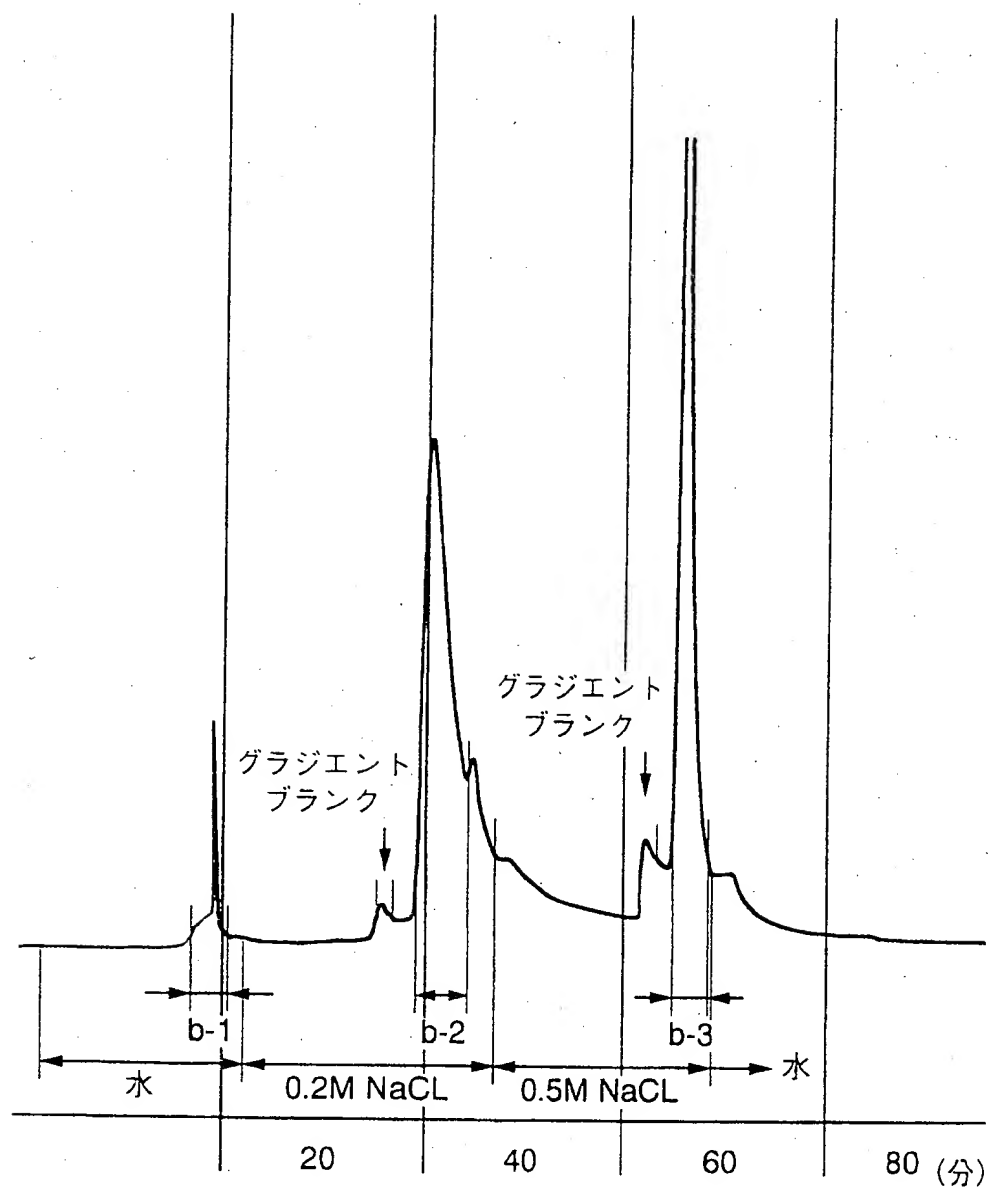
FIG.2



高分子成分（画分a）のDEAE分画

3/8

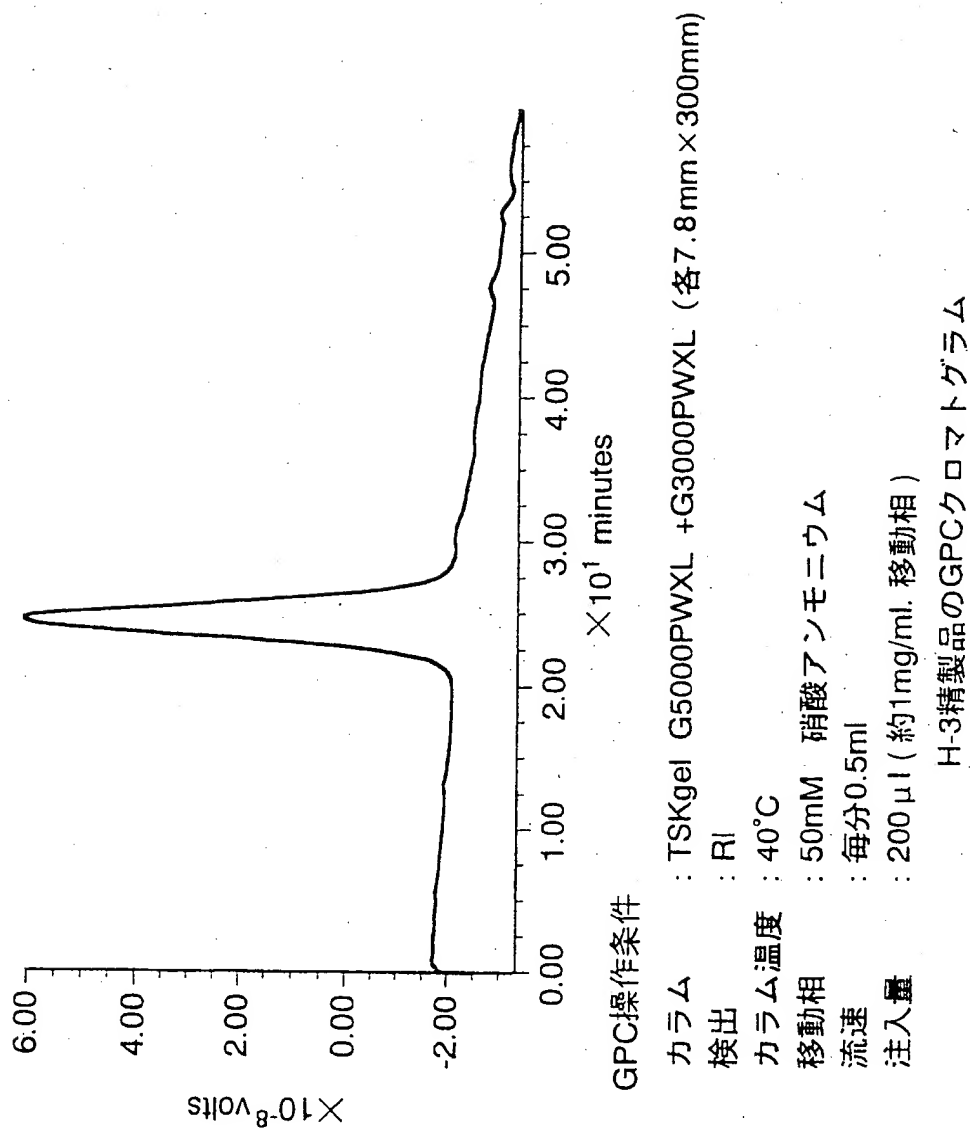
FIG.3



低分子成分 (画分b) のDEAE分画

4/8

FIG.4



5/8

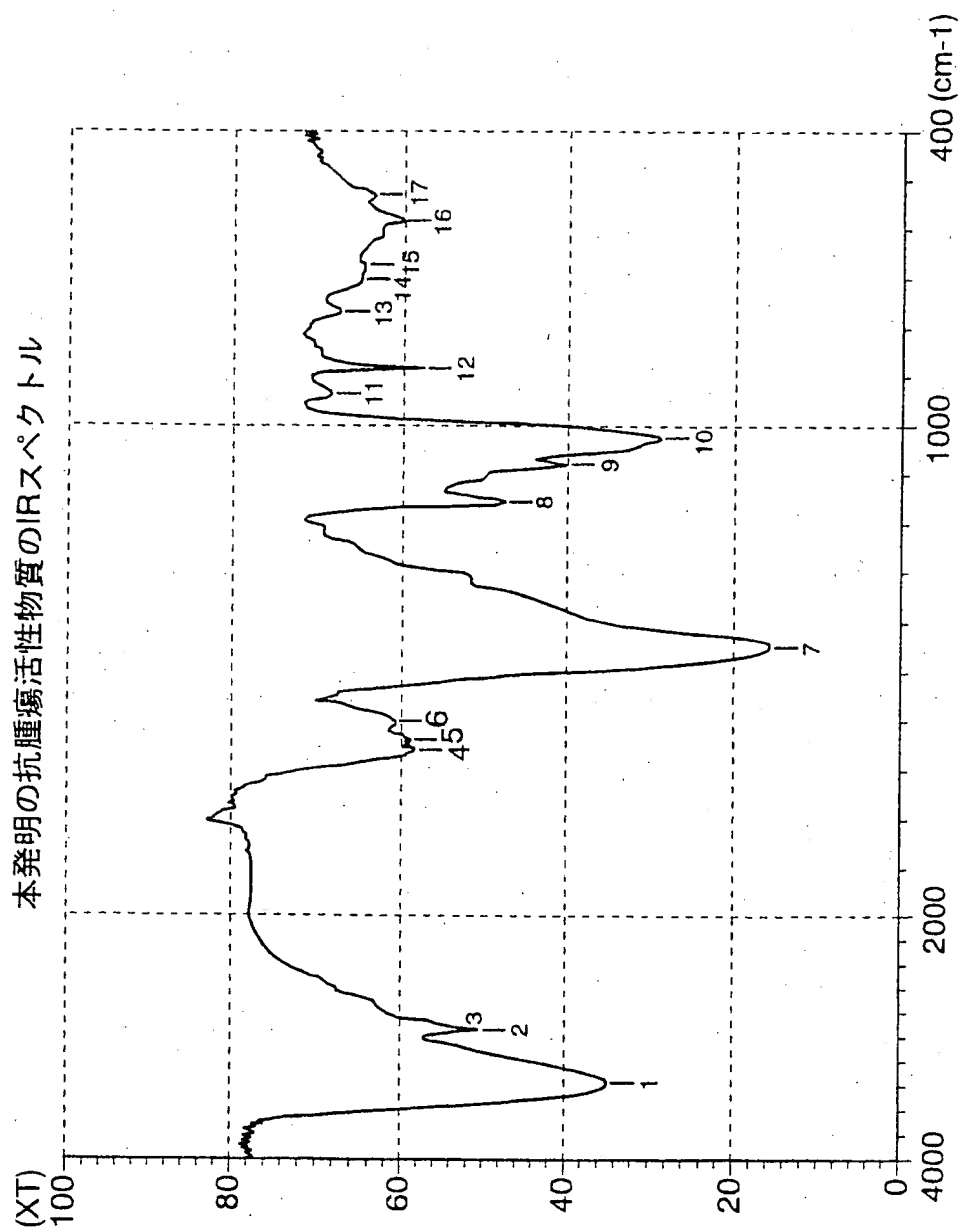
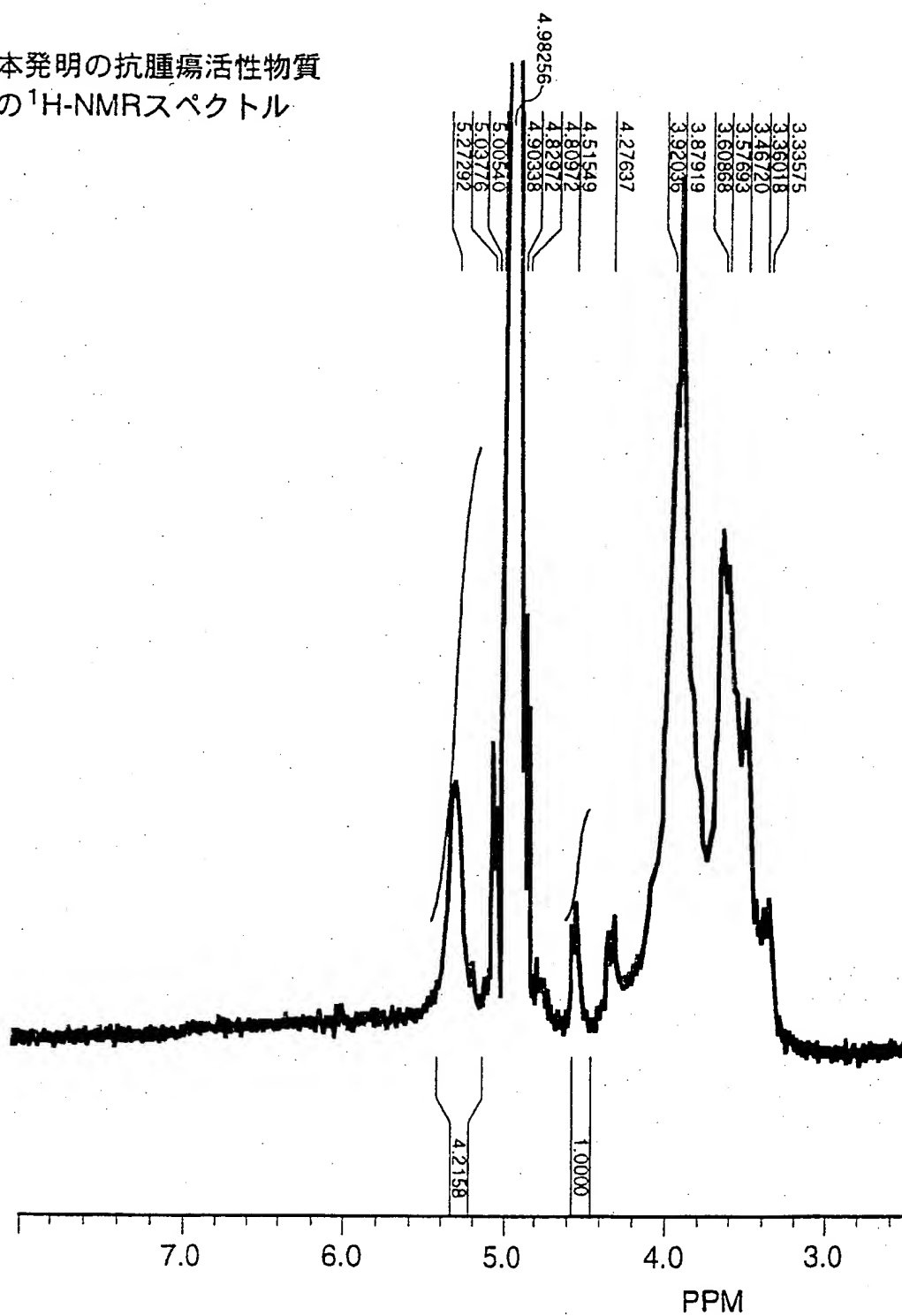


FIG.5

FIG.6A

本発明の抗腫瘍活性物質  
の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル



6/1/8

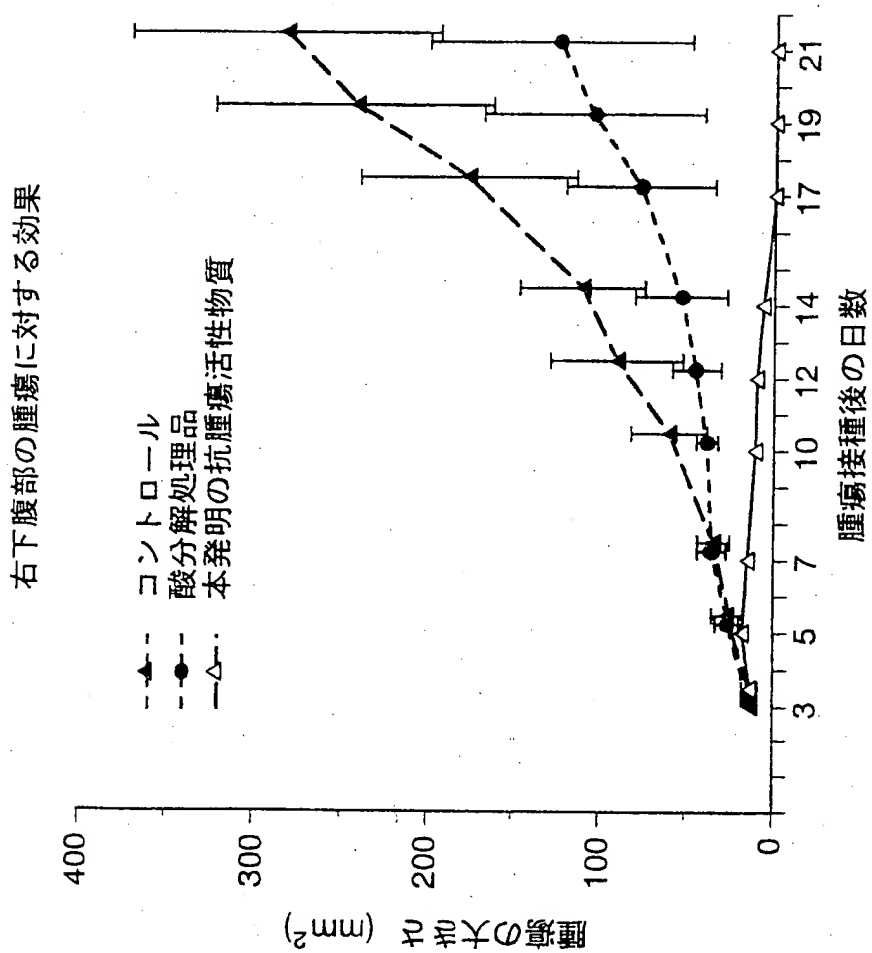
FIG.6B





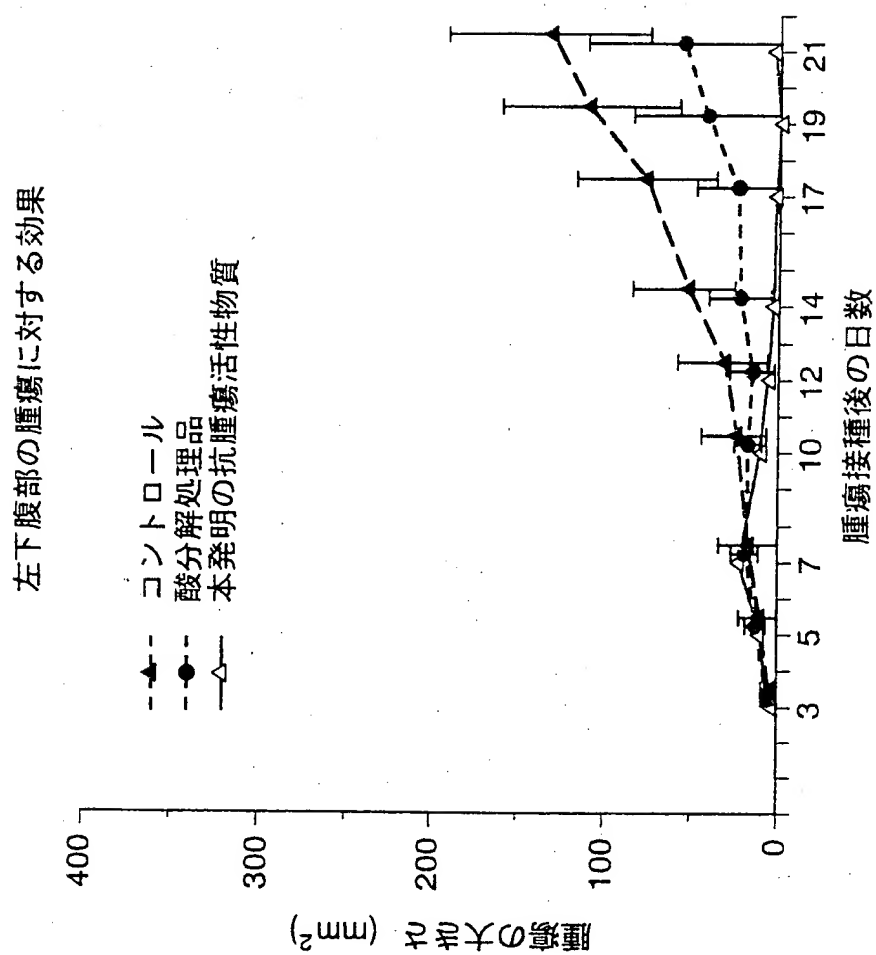
7/8

FIG. 7



8/8

FIG.8



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04352

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/84, A23L1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/84, A23L1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-9423, A (Sumitomo Forestry Co., Ltd.), January 18, 1994 (18. 01. 94), Claims (Family: none)	1 - 6
A	JP, 2-78630, A (Nichirei Corp.), March 19, 1990 (19. 03. 90), Claims (Family: none)	1 - 6
A	JP, 2-211847, A (K.K. Iwade Kingaku Kenkyusho), August 23, 1990 (23. 08. 90), Claims (Family: none)	1 - 6
A	JP, 8-165302, A (K.K. Iwade Kingaku Kenkyusho), June 25, 1996 (25. 06. 96) (Family: none)	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 3, 1998 (03. 02. 98)

Date of mailing of the international search report

February 10, 1998 (10. 02. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/04352

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A 61 K 35/84, A 23 L 1/28

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A 61 K 35/84, A 23 L 1/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 6-9423, A (住友林業株式会社), 18. 1月. 1994 (18. 01. 94), 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
A	J P, 2-78630, A (株式会社ニチレイ), 19. 3月. 1990 (19. 03. 90), 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
A	J P, 2-211847, A (株式会社岩出菌学研究所), 23. 8月. 1990 (23. 08. 90), 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
A	J P, 8-165302, A (株式会社岩出菌学研究所), 25. 6月. 1996 (25. 06. 96), (ファミリーなし)	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 02. 98

国際調査報告の発送日

10.02.1998

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保

4C

9159

電話番号 03-3581-1101 内線 3454